

# Лабораторная диагностика сифилиса: вчера, сегодня, завтра

Н.В. Фриго, С.В. Ротанов, Т.В. Манукьян, Г.Л. Катунин, А.А. Суворова, И.А. Волков, Н.В. Китаева

The laboratory diagnostics of syphilis: yesterday, today, tomorrow

N.V. FRIGO, S.V. ROTANOV, T.V. MANOUKIAN, G.L. KATUNIN, A.A. SUVOROVA, I.A. VOLKOV, N.V. KITAEVA

об авторах:

Н.В. Фриго — д.м.н., главный научный сотрудник, заведующий отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Т.Е. Манукьян — аспирант ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Г.Л. Катунин — сотрудник отделения сифилидологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

А.А. Суворова — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

И.А. Волков — к.б.н., научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Н.В. Китаева — к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения сифилидологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Освещены вопросы, касающиеся развития методов исследований, применяемых для диагностики сифилитической инфекции, в историческом аспекте, а также на ближайшую и отдаленную перспективу. Отмечены приоритеты применения отдельных методов исследования в зависимости от стадии и формы сифилиса, проведенного специфического лечения и контингента обследуемых. Приведены рекомендации к их использованию, отраженные в современных российских и зарубежных руководствах и стандартах диагностики сифилиса. Особо выделены современные методы исследования — иммунохемилюминесценция, xMAP-технология и отмечены аспекты их клинического применения. Приведены данные о применяемых методах молекулярного типирования *T. pallidum* и об определении генетических детерминант резистентности возбудителя сифилиса к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: **сифилис, методы диагностики, серологические исследования, иммунохемилюминесценция, xMAP-технология, молекулярное типирование, антибиотикорезистентность.**

The article covers issues related to the development of laboratory methods used for the diagnostic of syphilitic infection in the historical aspect as well as for the nearest and remote future. Priorities of the application of several diagnostic methods have been highlighted depending on the stage and form of syphilis, on the performed specific treatment and the contingent of examined patients. The authors give recommendations for its use reflected in modern Russian and foreign manuals and standards of syphilis diagnostics. Laboratory methods such as immunochemiluminescence assay, xMAP-technology and aspects of their clinical application are specially highlighted. The authors provide data on applied methods of molecular typing of *T. pallidum* and detection of genetic determinants of the resistance of the syphilis pathogen to antimicrobial substances.

Key words: **syphilis, methods of diagnostics, serologic research, immunochemiluminescence, xMAP technology, molecular typing, antibiotic resistance.**

■ Сифилис — системное инфекционное заболевание, вызываемое бледной трепонемой (*Treponema pallidum*, subspecies *pallidum*), характеризуется волнообразным прогрессирующим течением и разнообразными клиническими проявлениями с чередованием манифестных и скрытых периодов. Интерес к изучению заболевания обусловлен особенностями его распространения (половой путь передачи инфекции, наличие «ядерных» групп, обеспечивающих его распространение, — работников коммерческого секса, лиц, употребляющих наркотики внутривенно, мужчин, имеющих секс с мужчинами, и т. д.), уродующими человека внешними проявлениями заболевания, возможностью развития раннего и позднего врожденного сифилиса, а также поздних форм, сопровождающихся поражением нервной, сердечно-сосудистой систем и внутренних органов.

Начало изучения возбудителя сифилиса было ознаменовано выдающимся открытием профессоров Schaudinn и Hoffmann, установивших в 1905 г. возбудитель заболевания — бледную трепонему — *Treponema pallidum* [1, 2]. В 1909 г. A. Coles впервые описал применение темнопольной микроскопии для исследования бледной трепонемы, отметив при этом особенности движений микроорганизма [3]. Впоследствии, уже после открытия метода темнопольной микроскопии (ТПМ; dark field microscopy, DFM) для исследования бледной трепонемы, получили развитие другие методы прямой идентификации бледной трепонемы, в том числе метод прямой иммунофлюоресценции (ПИФ, direct immunofluorescent assay, DFA) и полимеразной цепной реакции (ПЦР; polymerase chain reaction, PCR) [4—7].

Кроме методов прямой детекции *T. pallidum* при обследовании на сифилис широкое применение получили серологические методы исследования, принцип которых заключается в определении в сыворотке или плазме крови пациентов антител, ассоциированных с сифилитической инфекцией.

Важной вехой развития серологической диагностики сифилиса следует признать открытие в 1906 г. Wassermann, Neisser и Bruck реакции связывания комплемента для серодиагностики сифилиса [8]. С тех пор прошло более 100 лет.

Реакция Вассермана, несомненно, сыграла свою историческую роль в становлении современной сифилидологии, так как способствовала установлению диагноза и длительности заражения при манифестных, скрытых формах инфекции, висцеральном сифилисе, обосновывала необходимость назначения превентивного лечения; способствовала установлению эффективности терапии (по снижению титров реакции). Однако этот метод — длительно выполняемый, дорогостоящий, субъективно интерпретируемый, часто дающий ложноотрицательные и ложноположительные результаты — не подлежит стандартизации, автома-

тизации и протоколированию результатов, а следовательно, не подлежит внешнему контролю. Таким образом, отдавая должное исторической роли реакции, предложенной Wassermann, Neisser и Bruck, следует признать, что в настоящее время реакция Вассермана — морально устаревший метод.

После открытия реакции Вассермана были разработаны другие нетрепонемные тесты: осадочные реакции [9, 10], флоккуляционный тест с кардиолипиновым антигеном без комплемента [11], VDRL — первая микрофлоккуляционная реакция для массового скрининга [12], быстрый плазмареагиновый тест — RPR [13], другие микрофлоккуляционные нетрепонемные тесты — USR [14], TRUST [15].

Начиная с 1949 г. получили свое развитие трепонемные тесты, основанные на выявлении трепонемоспецифических антител к возбудителю сифилиса, в том числе первый трепонемный тест — реакция иммобилизации бледных трепонем (РИБТ) [16], реакция иммунофлюоресценции (РИФ) [17—19], реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) [20, 21], иммуноферментный анализ (ИФА) [22, 23], метод иммуноблоттинга [24—28], простые быстрые тесты с использованием иммунохроматографического принципа исследования, например Syphilis Fast [29].

Из последних методов следует назвать метод иммунохемилюминесценции — ИХЛ (Chemiluminescence Immunoassay — CLIA) [30, 31] и MAP-технологии [32, 33], которые пока не регламентированы к применению на территории Российской Федерации.

Хемилюминесценция — процесс излучения фотонов при переходе электронно-возбужденных продуктов окислительных химических реакций в исходное энергетическое состояние. В ходе реакции хемилюминесценции выделяется значительное количество энергии, и квантовый выход излучаемого света достаточно высок. Из всех неизотопных методов хемилюминесценция обеспечивает наиболее высокую чувствительность. Для иммунометрических методов чувствительность хемилюминесценции на порядки превосходит чувствительность радиоиммуноанализа.

Метод иммунохемилюминесценции в настоящее время нашел свое применение при диагностике маркеров опухолей, аутоиммунных заболеваний, диабета, кардиомаркеров, гормонов (щитовидной железы, надпочечников, женских и мужских половых гормонов), TORCH-инфекций, вирусных гепатитов, вирусов группы герпеса.

На основе метода иммунохемилюминесценции разработан ряд высокочувствительных и специфичных (98—100%) тест-систем для диагностики сифилиса, применяемых в основном за рубежом [30, 31].

xMAP-технология — современная технология, позволяющая проводить многопараметрические исследования путем одновременной детекции множества аналитов в одном биологическом образце. В качестве

твердой фазы используются окрашенные микросферы, покрытые захватывающими реагентами (олигонуклеотидами, антителами, антигенами). Исследуемый образец добавляется к раствору, в котором содержатся микросферы. Выявляемые в образце аналиты связываются с соответствующей микросферой, после чего в раствор вносится детектирующий агент (детектирующие антитела, флюоресцентная метка). Для детекции определяемого аналита используется система двух лазеров, позволяющих проводить как качественную оценку наличия аналита в пробе (для этого используется красный лазер, классифицирующий микросферы по цвету), так и количественную оценку содержания аналита в пробе (для этого используется зеленый лазер). Исследование осуществляется в автоматическом режиме на анализаторах типа BioPlex200 (Bio-Rad), BioPlex2200 (Bio-Rad), Luminex100 (Luminex), снабженных программным обеспечением.

хМАР-технология, обладающая высокой аналитической чувствительностью, в настоящее время используется для решения широкого круга клинических задач. С ее помощью в одном образце биологического материала осуществляется одновременная детекция известных онкомаркеров, кардиомаркеров, маркеров острой фазы и сахарного диабета, широкого спектра цитокинов, хемокинов, факторов роста. Одномоментное выявление множества аналитов в одном биологическом образце позволяет существенно сократить время обследования пациента [32, 33]. К настоящему времени разработан ряд тест-систем для выявления антител к возбудителям ИППП, в частности сифилитической инфекции, методом хМАР [34].

Следует подчеркнуть роль отечественных ученых, в частности представителей научной школы ЦНИКВИ, в развитии учения о возбудителе сифилиса и разработке серологических реакций для диагностики сифилиса.

В работах профессоров Н.М. Овчинникова, В.В. Делекторского на основании данных электронной микроскопии была подробно описана морфология бледной трепонемы, определены ее размер и структура, описаны клеточная стенка, фибриллы, блефаропласты и другие компоненты, цисты и L-формы возбудителя сифилиса [35]. Большое значение для развития отечественной серологической диагностики сифилиса имели работы Н.М. Овчинникова, В.Н. Бедновой, Л.В. Сазионовой, Г.Ф. Тимченко и других исследователей, результаты которых позволили изучить и разработать методики постановки различных лабораторных тестов [36—44].

Знания о возбудителе сифилиса были значительно расширены после разработки технологии производства рекомбинантных антигенов бледной трепонемы на основе применения генно-инженерных методов или синтетических пептидов, получаемых путем биохимического синтеза. При этом был получен ряд высоко-

иммуногенных антигенов возбудителя с молекулярной массой 17, 47, 42—44, 38, 15, 4 кД и др., что позволило оптимизировать серологическую диагностику сифилиса, повысить чувствительность и специфичность применяемых тест-систем [45—52].

В 80-е годы XX века получили свое развитие молекулярно-биологические методы диагностики: была разработана полимеразная цепная реакция (ПЦР) [53], которая с начала 90-х годов стала использоваться для выявления ДНК и/или РНК бледной трепонемы [6, 7].

В 1998 г. группой исследователей из США [54] был расшифрован геном бледной трепонемы (см. рис.).

Полная нуклеотидная последовательность генома *T. pallidum* составляет 1 138 006 пар оснований. Установлено, что микроорганизм включает 42 семейства генов, ответственных за основные жизнеобеспечивающие функции: механизмы репликации ДНК, транскрипции, трансляции, энергетический метаболизм, процессы клеточного деления и секреции белков. При анализе генома выявлены потенциальные факторы вирулентности микроорганизма, к которым относятся 12 белков, родственных «большому оболочечному белку» (major sheath protein — Msp) *T. denticola*, ряд гемолизин и некоторые другие классы белков. Установлено, что двигательная активность бледной трепонемы обеспечивается 36 генами, кодирующими белки жгутиковых структур. Обнаружены также две копии белка «выключателя» и 13 генов, кодирующих гомологи белков хемотаксиса, в том числе Che A, Che W, Che Y.

Расшифровка в 1998 г. полной геномной последовательности бледной трепонемы открыла новые

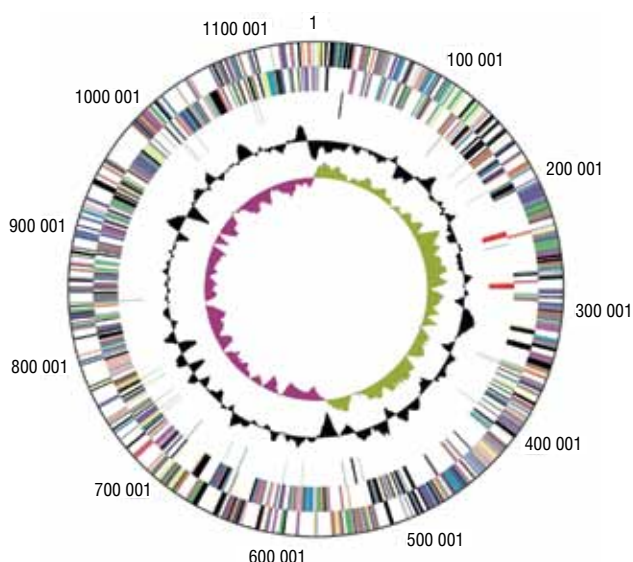


Рис. Геном *Treponema pallidum* (Fraser С.М. и соавт. 1998 [54])

горизонты в изучении сифилитической инфекции, направленные на создание новых антимикробных препаратов и вакцин, разработку диагностических методов путем наработки продуктов кандидатных генов в «суррогатных» хозяевах, осуществление эффективной дифференциальной диагностики на основе полученных данных о различии геномов возбудителей.

В последние десятилетия получили развитие молекулярно-генетические методы изучения возбудителя сифилиса, направленные на выявление закономерностей распространения штаммов *T. pallidum* на различных географических территориях («молекулярная эпидемиология») и изучение антибиотикорезистентности возбудителя сифилиса.

Молекулярное типирование бледной трепонемы, выделенной от больных сифилисом, было впервые проведено в США и ЮАР А. Pillay и соавт. (2002) [55, 56]. Применение молекулярного типирования *Treponema pallidum* позволило А. Pillay и соавт. обнаружить доминирование субтипа 14f в период вспышки заболеваемости сифилисом в Аризоне (США), а также наличие тесной и прямой корреляции между количеством определяемых субтипов бледной трепонемы и превалентностью сифилиса в Южной Африке. В более поздних исследованиях была установлена распространенность различных субтипов *T. pallidum* в странах мира. При этом в Китае доминантным субтипом является субтип 14f, на втором месте — субтип 14d [57], в Канаде — субтип 14d [58], в Португалии доминирующим субтипом является субтип 14a, на втором месте — субтип 14d [59], в Шотландии — субтип 14d [60]. Самым распространенным почти на всех территориях, где проводились исследования, оказался субтип 14d. Авторы предполагают, что данный субтип бледной трепонемы, вероятно, был исходным субтипом, по крайней мере, для исследованных территорий [61]. Результаты молекулярного типирования бледной трепонемы позволяют изучать закономерности распространения штаммов возбудителя сифилиса в различных географических зонах мира, устанавливать их ассоциацию со вспышками заболевания и уровнем заболеваемости сифилисом, а также взаимосвязь с половозрастными, социальными, этническими, поведенческими и другими особенностями групп населения.

Рядом исследователей [62] при проведении молекулярного типирования штаммов *T. pallidum*, полученных от больных нейросифилисом и без нейросифилиса, установлена ассоциация субтипа *T. pallidum* 14 d/f с повышенным риском развития нейросифилиса, что позволяет обосновать необходимость проведения люмбальной пункции в целях исследования ликвора пациентам, у которых выявляется данный субтип *T. pallidum*, и прогнозировать развитие у них нейросифилиса.

В настоящее время во всем мире отмечается рост резистентности возбудителей ИППП к антимикробным препаратам, что вызывает значительные затруднения при выборе методов лечения пациентов. Пенициллин до сих пор является эффективным при лечении сифилитической инфекции. Однако относительно недавно появились сообщения об устойчивости возбудителя сифилиса *T. pallidum* к макролидам, которые также широко используются для лечения сифилиса. Обнаружено, что резистентность возбудителя сифилиса к макролидам обусловлена двумя точечными мутациями в области генов, кодирующих 23S rRNA *T. pallidum*: A2058G и A2059G. Относительно высокий риск заражения мутантным штаммом *T. pallidum* имеют лица, которые в течение последнего года до обращения получали макролиды. Штаммы *T. pallidum*, устойчивые к макролидам, распространены в некоторых развитых странах: США, Австралии, Канаде, Китае, что вызвало необходимость изменения подходов к лечению сифилиса макролидами в этих странах [63—65].

Таким образом, XX век и начало XXI века были ознаменованы значительными успехами как в изучении возбудителя сифилитической инфекции, так и в развитии методов диагностики сифилитической инфекции.

Чем же располагает лабораторная диагностика сифилиса сегодня?

Согласно современным представлениям применение лабораторных методов исследования является основанием для установления окончательного и предварительного клинического диагноза инфекционного заболевания.

**Окончательный диагноз** сифилитической инфекции основан на обнаружении *T. pallidum* в биологических образцах с помощью прямых методов диагностики: путем микроскопии в темном поле зрения (DFA-TP) и молекулярно-биологических методов, прежде всего ПЦР, при использовании диагностикомов, разрешенных к медицинскому применению.

**Предварительный диагноз** сифилитической инфекции устанавливается при получении положительных результатов серологических тестов. Серологические (непрямые) методы продолжают играть важную роль при диагностике сифилиса из-за того, что возбудитель сифилиса не культивируется на питательных средах *in vitro*, а также вследствие часто наблюдаемого в последние годы скрытого течения инфекции и трудности получения биологического материала, пригодного для прямой идентификации *T. pallidum*. К числу непрямых методов диагностики сифилиса относятся нетрепонемные и трепонемные тесты.

Среди нетрепонемных тестов (в которых применяется антиген нетрепонемного происхождения) в настоящее время наиболее часто используют:

в России — РМП — реакцию микропреципитации с плазмой и инактивированной сывороткой, за рубежом — RPR — тест быстрых плазменных реагенов (Rapid Plasma Reagins), или быстрый плазмареагиновый тест, и VDRL — Venereal Disease Research Laboratory — тест Исследовательской лаборатории венерических заболеваний [66, 67].

Основными показаниями к применению нетрепонемных методов диагностики сифилиса являются: проведение скрининга населения на сифилис, определение активности течения инфекции и контроль эффективности специфической терапии путем определения титра антител.

Среди трепонемных тестов (в которых применяется антиген трепонемного происхождения) используют ИФА, ИХЛ, РПГА, РИФ [66, 67].

Иммуноблоттинг (как правило, применяется метод линейного иммуноблоттинга, являющийся вариантом иммуноферментного анализа) применяется в двух вариантах: для выявления IgG и IgM-антител к возбудителю сифилиса [27, 28, 68, 69].

РИБТ (РИТ) — реакция иммобилизации бледных трепонем (TPI — *Treponema pallidum* immobilization

test) [16] в последние годы применяется все реже — только в научных целях и в исследовательских лабораториях [70].

Основными показаниями к применению трепонемных методов диагностики сифилиса являются: подтверждение положительных результатов нетрепонемных тестов; подтверждение в случае расхождения результатов скринингового трепонемного теста и последующего нетрепонемного теста, а также скринингового и подтверждающего трепонемных тестов; проведение методами ИФА, РПГА скрининга отдельных категорий населения на сифилис (доноры, больные офтальмологических, психоневрологических, кардиологических стационаров).

Трепонемные тесты не могут быть использованы для контроля эффективности терапии, так как анти-трепонемные антитела могут длительно циркулировать в организме больного, перенесшего сифилитическую инфекцию.

В таблице суммированы основные положения последних рекомендаций по диагностике сифилиса, разработанных Центрами по контролю над заболеваниями США (Centers for Disease Control and

ТАБЛИЦА

Рекомендации по диагностике сифилиса в странах Европы, США и России

Метод	Россия	Европа	США
ТПМ/DFM	+	+	+
ПИФ/DIF	—	+	—
ПЦР/PCR	+	+	+
	(при условии использования тест-систем, разрешенных к медицинскому применению)	(с образцами, полученными из ротовой полости; при третичном, врожденном сифилисе)	(некоторые лаборатории)
РМП, RPR, VDRL	+	+	+
	(скрининг, определение активности процесса, контроль эффективности терапии)	RPR, VDRL (установление диагноза, контроль эффективности терапии)	RPR, VDRL (скрининг, установление диагноза, контроль эффективности терапии)
РПГА/ТРНА/ТРПА	+	+	+
	(подтверждение/скрининг)	(скрининг/подтверждение; предпочтительный скрининговый тест)	(скрининг/подтверждение)
ИФА/ИХЛ (EIA/CLIA)	+	+	+
	(подтверждение/скрининг)	ИФА/ИХЛ (ИФА — скрининг/подтверждение)	ИФА/ИХЛ (скрининг/подтверждение)
РИФ/FTA	+	+	+
	скрытый сифилис (подтверждение)	не для скрининга (подтверждение)	не для скрининга (подтверждение)
РИБТ/TPI	+	—	—
	скрытый сифилис (подтверждение)		
IgG-иммуноблоттинг	+	+	—
	(подтверждение; дополнительное подтверждение)	(дополнительное подтверждение)	

Примечание: + тест рекомендуется к применению, — тест не рекомендуется к применению.



Prevention — CDC), Международным союзом по борьбе с инфекциями, передаваемыми половым путем, в Европе (International Union against Sexually Transmitted Infections — IUSTI), Государственным научным центром дерматовенерологии и косметологии (Россия) в рамках подготовки проектов стандартов оказания специализированной медицинской помощи больным сифилисом и международного сотрудничества с Восточно-Европейской сетью репродуктивного здоровья [66, 67, 71, 72].

Как следует из приведенных данных, все рекомендации по диагностике сифилиса включают прямой метод диагностики — ТПМ. В Европейских рекомендациях указывается также на возможность применения метода ПИФ при возможности использования соответствующих наборов реагентов.

Метод ПЦР также рекомендован к применению для диагностики сифилиса Европейским IUSTI, в особенности при локализации сифилитических высыпаний в полости рта или в других местах, подвергающихся контаминации трепонемами-комменсалами, а также при третичном и врожденном сифилисе. В США применение ПЦР рекомендовано лабораториям, располагающим соответствующими тест-системами (в том числе созданными в самих лабораториях, *in house*). В России и странах Восточной Европы широкое использование метода лимитируется небольшим количеством наборов реагентов, прошедших валидацию и разрешенных к медицинскому применению на территории соответствующих государств.

Из непрямых методов диагностики сифилиса все рекомендации включают применение:

- нетрепонемных тестов (РМП, RPR) для скрининга (Россия, США), установления диагноза (RPR, VDRL — Европа, США) и контроля эффективности терапии (все страны);
- РПГА и ИФА для скрининга на сифилис и подтверждения диагноза; в европейских странах и США с этой целью рекомендовано также применение метода ИХЛ;

■ РИФ, но не в качестве скринингового и стандартного подтверждающего теста, а при необходимости дополнительного подтверждения в случае расхождения результатов скрининговых и подтверждающих трепонемных тестов. В российских проектах стандартов оказания специализированной медицинской помощи больным сифилисом РИФ рекомендована в качестве подтверждающего теста преимущественно при скрытом течении сифилитической инфекции.

РИБТ к настоящему времени исключена из стандартов диагностики сифилиса в странах Европы и США; в российских проектах стандартов оказания специализированной медицинской помощи больным сифилисом применение РИБТ рекомендовано только для подтверждения диагноза скрытого сифилиса.

Метод IgG-иммуоблоттинга в настоящее время включен в стандарты диагностики сифилиса в европейских странах (IUSTI) как дополнительный подтверждающий тест в случае несовпадения результатов скринингового и подтверждающего трепонемных тестов.

Таким образом, приведенные данные убедительно показывают, что на сегодняшний день сифилидология достигла значительных успехов в развитии диагностики и в изучении возбудителя сифилиса. Современная лабораторная база располагает обширным арсеналом общеизвестных и инновационных технологий, которые могут быть с успехом использованы для диагностики сифилиса. Рациональное и целенаправленное использование этих технологий, усовершенствование существующих методов и диагностикумов, разработка стандартов и алгоритмов диагностики сифилиса, молекулярно-генетических технологий позволяют поднять отечественную сифилидологию на качественно новый уровень и осуществлять эпидемиологический надзор и контроль за распространением сифилитической инфекции на территории Российской Федерации. ■

## Литература

1. Schaudin F. Fur Kenntniss der Spirochaeta pallida. Dtsch Med Wochenschr 1905; 31: 1665.
2. Schaudin F, Hoffmann P. Vorläufiger bericht über das vorkommen von Spirochäten in syphilitischen krankheitsprodukten und bei papillomen. Arb GesundhAmte (Berl) 1904-5; 22: 527—534.
3. Coles A.C. Spirochaeta pallida: Methods of examination and detection, especially by means of the dark-ground illumination. Br Med 1909; 1: 1117—1120.
4. Yobs A.R., Brown L., Hunter E.F. Fluorescent antibody technique in early syphilis. Arch Pathol 1964; 77: 220—225.
5. Romanowski B., Forsey E., Prasad E., Lukehart S., Tam. M., Hook EW. Detection of Treponema pallidum by a fluorescent monoclonal antibody test. Sex Transm Dis 1987; 22: 156—9.
6. Grimpel E., Sanchez P.J., Wendel G.D. et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect Treponema pallidum in amniotic fluid. J Clin Microbiol 1991; 29: 1711—1718.
7. Noordhoek G.T., Wolters E.C., De Jonge M.E. et al. Detection by polymerase chain reaction of Treponema pallidum DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. J Clin Microbiol 1991; 29: 1976—1984.
8. Wassermann A., Neisser A., Bruck C. Eine serodiagnostische reaktion bei Syphilis. Dtsch Med Wochenschr 1906; 32: 745—746.
9. Michaelis L. Precipitinreaktion bei syphilis. Berlinische Klinische Wochenschrift. 1907; 44: 1477—8.

10. Meinicke E. Ueber eine neue Methode der serologischen lues Diagnose. Berlin Klin Wochenschr 1917; 54: 613—4.
11. Kahn R.L. A simple quantitative precipitation reaction for syphilis. J Arch Dermatol Syphilol 1992; 5: 6: 570—578, 734—743, 332—341.
12. Harris A., Rosenberg A.A., Riedel L.M. A micro-flocculation test for syphilis using cardiolipin antigen: Preliminary report. J Vener Dis Inform 1946; 27: 159—172.
13. Portnoy J., Carson W., Smith C.A. Rapid plasma reagin test for syphilis. Pub Health Rep 1957; 72: 761—766.
14. Portnoy J., Bossak H.W., Falcone V.H. et al. A rapid reagin test with unheated serum and new improved antigen suspension. Pub Health Rep 1961; 76: 933—935.
15. Pettit D.E., Larsen S.A., Harbec P.S. et al. To-luidine red unheated serum test, a nontreponemal test for syphilis. J Clin Microbiol 1983; 18: 1141—1145.
16. Nelson R.A. Jr., Mayer M.M. Immobilization of Treponema pallidum in vitro by antibody produced in syphilitic infection. J Exp Med 1949; 89: 369—393.
17. Deacon W.E., Falcone V.H., Harris A. A fluorescent test for treponemal antibodies. Proc Soc Exp Biol Med 1957; 96: 477—480.
18. Deacon WE, Freeman EM, Harris A. Fluorescent treponemal antibody test. Modification based on quantitation (FTA-200) Proc Soc Exp Biol Med 1960; 103: 827—9.
19. Hunter E.F., Deacon W.E., Meyer P.E. An improved FTA test for syphilis, the absorption procedure (FTA-ABS). Public Health Rep 1964; 79: 410—412.
20. Rathlev T. Hemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic Treponema pallidum. Br J Vener Dis 1967; 43: 181—185.
21. Cox P.M., Logan L.C., Norins L.C. Automated, quantitative microhemagglutination assay for Treponema pallidum antibodies. Appl Microbiol 1969; 18: 485—489.
22. Veldekamp J., Visser A.M. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1975; 51: 227—231.
23. Pope V., Hunter E.F., Feeley J.C. Evaluation of the microenzyme-linked immunosorbent assay with Treponema pallidum antigen. J Clin Microbiol 1982; 15: 630—4.
24. Lewis L.L., Taber L.N., Baughn R.E. Evaluation of immunoglobulin M western blot analysis of congenital syphilis. J Clin Microbiol 1990; 28: 2: 296—302.
25. George R.W., Pope V., Larsen S.A. Use of the Western blot for the diagnosis of syphilis. Clin Immunol Newsletter 1991; 8: 124—128.
26. Meyer M.P., Eddy T., Baughn R.E. Analysis of Western blotting (Immunoblotting) technique in diagnosis of congenital syphilis. J Clin Microbiol 1994; 32: 629—633.
27. Marangoni A., Sambri V., Olmo A. et al. IgG western blot as a confirmatory test in early syphilis. Zentralbl Bacteriol 1999; 289: 2: 125—133.
28. Hagedorn H.J., Kraminer-Hagedorn A., De Bosschere K. et al. Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. J Clin Microbiol 2002; 40: 3: 973—978.
29. Young H., Moyes A., de Ste Croix I. et al. A new recombinant antigen latex agglutination test (Syphilis Fast) for the rapid serological diagnosis of syphilis. Int J STD AIDS 1998, 9(4): 196—200.
30. Marangoni A., Sambri V., Accardo S. et al. Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. Clin Diagn Lab Immunol 2005, 12(10): 1231—1234.
31. Young H., Pryde J., Duncan L. et al. The Architect Syphilis assay for antibodies to Treponema pallidum: an automated screening assay with high sensitivity in primary syphilis. Sex Transm Infect 2009; 85: 19—23.
32. Binnicker M.J., Jespersen D.J., Harring J.A. et al. Evaluation of a multiplex flow immunoassay for detection of Epstein-Barr virus-specific antibodies. Clin Vaccine Immunol 2008 (Sep); 15(9): 1410—1413.
33. Binnicker M.J., Jespersen D.J., Harring J.A. Multiplex Detection of IgM and IgG Class Antibodies to Toxoplasma gondii, Rubella Virus, and Cytomegalovirus Using a Novel Multiplex Flow Immunoassay. Clinical and Vaccine Immunology 2010 (Nov); 17 (11): 1734—1738.
34. Gomez E., Jespersen D.J., Harring J.A. et al. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 Syphilis Multiplex Flow Immunoassay for the Detection of IgM- and IgG-Class Antitreponemal Antibodies. Clinical and Vaccine Immunology 2010 (Jun); 17 (6): 966—968.
35. Овчинников Н.М., Делекторский В.В. Атлас электронной микроскопии некоторых представителей рода трепонем, рода нейссерия и трихомонад. М: Медицина 1974; 53.
36. Овчинников Н.М. Лабораторная диагностика венерических заболеваний. М.: Медицина 1969; 232.
37. Беднова В.Н. Иммунолюминесцентный анализ в диагностике сифилиса. Иммунолюминесценция в медицине. М: Медицина 1977; 72—79.
38. Овчинников Н.М., Милонова Т.И., Тимченко Г.Ф. и др. Сравнительное изучение РПГА, иммунофлюоресценции с адсорбцией и микропреципитации с активной сывороткой крови на сифилис // Вестн. дерматол. и венерол. 1983; 5: 17—20.
39. Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. М.: Медицина, 1987; 302.
40. Беднова В.Н., Тимченко Г.Ф. Сравнительное изучение РПГА с диагностикой из патогенных и культуральных бледных трепонем при различных формах сифилиса // Вестн. дерматол. и венерол. 1988; 4: 43—45.
41. Тимченко Г.Ф., Беднова В.Н., Басова Н.Н. и др. Чувствительность и специфичность реакции пассивной гемагглютинации с эритроцитарными диагностикомми из культуральных и патогенных бледных трепонем // Вестн. дерматол. и венерол. 1988; 3: 20—21.
42. Сазонова Л.В. Лабораторная диагностика сифилиса. В рук-ве: Шапошников О.К. (ред.) Венерические болезни. Лабораторная диагностика сифилиса. М: Медицина 1991; 246—266.
43. Беднова В.Н., Коляденко В.Г., Павлова Е.В. и др. Новый сорбент для постановки РИФА на сифилис // Вестн. дерматол. и венерол. 1992; 6: 37—39.
44. Беднова В.Н., Дмитриев Г.А., Бабий А.В. Новая тест-система иммуноферментного анализа для серодиагностики сифилиса // Вестн. дерматол. и венерол. 1995; 1: 19—20.
45. Baker-Zander S.A., Hook E.W. 3rd, Bonin P., Handsfield H.H. et al. Antigens of Treponema pallidum recognized by IgG and IgM antibodies during syphilis in humans. J Infect Dis 1985; 151 (2): 264—272.
46. Cox D.R., Chang A., Mc Dowall A. et al. The outer membrane not a coat of host proteins, limits the antigenicity of virulent Treponema pallidum. Infect Immun 1992; 60: 1076—1083.
47. Gerber A., Krell S., Morenz J. Recombinant Treponema pallidum antigens in syphilis serology. Immunobiol 1997; 196 (5): 535—549.
48. Гражданцева А.А., Кочнева Г.В., Свилов Г.Ф. и др. Исследование сывороток больных сифилисом методом иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных антигенов. Иммунология 1998; 4: 20—23.
49. Haake D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology 2000; 146: 1491—1504.
50. Van Voorhis W.C., Barrett L.K., Lukehart S.A. et al. Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by Treponema pallidum. J Clin Microbiol 2003; 41: 3668—3674.
51. LaFond R., Lukehart S. Biological Basis for Syphilis. Clinical Microbiology Reviews 2006; 19(1): 29—49.
52. Чепурченко Н.В., Гладышева М.В., Обрядина А.П. Новые возможности использования рекомбинантных антигенов в серодиагностике сифилиса // Клин. дерматол. и венерол. 2006; 2: 28—31.
53. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. Meth Enzymol 1987; 155: 335.
54. Fraser C. M., Norris S. J., Weinstock G. M. et al. Complete genome sequence of Treponema pallidum, the syphilis spirochete. Science 1998; 281: 375—388.
55. Pillay A., Liu H., Chen C.Y. et al. Molecular subtyping of Treponema pallidum subspecies pallidum. Sex Transm Dis 1998; 25 (8): 408—414.

56. Pillay A., Liu H., Ebrahim S. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (1): 256—258.
57. Martin I.E., Gu W., Yang Y. et al. Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clin Infect Dis* 2009 49: 515—521.
58. Martin I.E., Tsang R.S., Sutherland K. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains in western Canada: predominance of 14d subtypes. *Sex Transm Dis* 2010; 37: 544—548.
59. Florindo C., Reigado V., Gomes J.P. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* clinical strains from Lisbon, Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; Nov: 3802—3803.
60. Cole M.J., Chisholm S.A., Palmer H.M. et al. Molecular epidemiology of syphilis in Scotland. *Sex Transm Infect* 85: 447—451.
61. Peng R.R., Wang A.L., Li J. et al. Molecular Typing of *Treponema pallidum*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2011 Nov; 5(11): e1273; Epub 2011 Nov 8.
62. Marra C.M., Sahi S.K., Tantaló L.C. et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. *J Infect Dis* 2010; 202(9): 1380—8.
63. Lukehart S. A., Gordones C., Molini B. J. et al. Macrolide resistance in *Treponema pallidum* in the United States and Ireland. *N Engl J Med* 2004; 351: 154—158.
64. Matejkova P., Flasarova M., Zakoucka H. et al. Macrolide treatment failure in a case of secondary syphilis: a novel A2059G mutation in 23S rRNA gene of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *J Med Microbiol* 2009; 58: 832—836.
65. Stamm L. Global Challenge of Antibiotic-Resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54 (2): 583—589.
66. French P., Gombert M., Janier M. et al. IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *Int J STD AIDS*. 2009; 20(5): 300—9.
67. Center for disease control prevention, Sexually transmitted diseases treatment guidelines. CDC. *MMWR* 2010, 59 (RR12): 1—110.
68. Sambri V., Marangoni A., Eyer C. et al. Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001; 534—539.
69. Фриго Н.В., Дударева Л.А., Ротанов С.В. и др. Иммуноблоттинг в диагностике ранних форм сифилиса // *Вестн. дерматол. и венерол.* 2008; 4: 57—62.
70. Paris-Hamelin A., Debryne M., Fustec-Isar-boure S. Immunoblotting for the serodiagnosis syphilis. A candidate to replace the Nelson-Mayer test. *Ann Pharm Fr.* 1999; 57(1): 67—75.
71. Соколовский Е.В., Фриго Н.В., Ротанов С.В. и др. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы // *Вестн. дерматол. и венерол.* 2008; 5: 87—96.
72. Sokolovskiy E., Frigo N., Rotanov S. et al. Guidelines for laboratory diagnosis of syphilis in East-European countries. *J EADV* 2009; 23 (6): 623—632.